

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 57-183799

(43)Date of publication of application : 12.11.1982

(51)Int.Cl.

C07H 21/00  
C12N 15/00  
// C12R 1/13  
C12R 1/15

(21)Application number : 56-058186

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD

(22)Date of filing : 17.04.1981

(72)Inventor : KATSUMATA RYOHICHI  
OKA TETSUO  
FURUYA AKIRA

## (54) NOVEL PLASMID

## (57)Abstract:

NEW MATERIAL: A plasmid having the gene concerning in the streptomycin- and/or spectinomycin-resistance, and autonomically replicable in the bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus.

EXAMPLE: The plasmid pCG4 having a molecular weight of about 19 mega-dalton. The numbers of the sensitive sites of the plasmid to restriction enzymes are 4, 7, 9, 6 and 6 corresponding to EcoRI, BamHI, HindII, PstI and SalI, respectively.

USE: Useful as a clone-forming vector for bacteria belonging to *Corynebacterium* genus or *Brevibacterium* genus or species close to the above genera, and as a reagent for the research of recombinant DNA.

PROCESS: For example, *Corynebacterium glutamicum* 225-250 (FERM-P No.5939) is cultured, and the bacterial cells are subjected to the bacteriolysis. The objective plasmid pCG4 can be separated from the bacteriolytic product by conventional method.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-183799

⑥ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 21/00  
C 12 N 15/00  
// C 12 R 1/13  
1/15

識別記号

庁内整理番号  
7252-4C  
7235-4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)11月12日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 11 頁)

⑭ 新規プラスミド

⑯ 特 願 昭56-58186

⑰ 出 願 昭56(1981)4月17日

⑱ 発 明 者 勝亦瞭一

町田市成瀬2-12-3 ポプラケ  
丘コープ6-401

⑲ 発 明 者 岡徹夫

町田市旭町1-12-2

⑳ 発 明 者 古屋晃

川崎市多摩区多摩美1-10-5

㉑ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6  
番1号

明 細 書

A. 発明の名称

新規プラスミド

B. 特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物中で自複製能でき、かつストレプトマイシンおよび/またはスペクテノマイシン耐性に関与する遺伝子を有する新規プラスミド。
- (2) 該プラスミドが、コリネバクテリウム属微生物から得られることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。
- (3) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルメリキウムに属する微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載のプラスミド。
- (4) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルメリキウム335-330であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のプラスミド。
- (5) 該プラスミドが、コリネバクテリウム・グ

ルメリキウム335-330から得られ、約17  
メガダルトンの分子量を有し、かつ制限酵素  
に対する感受性部位数がEcoRI、BamHI、  
HindIII、PstIおよびSalIにおいてそれ  
ぞれ、6、7、6および6であることを特  
徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラス  
ミド。

C. 発明の詳細な説明

本発明は新規プラスミドに関する。さらに詳  
しくは、本発明はコリネバクテリウム属または  
プレビバクテリウム属に属する微生物中で自複  
複製能でき、かつストレプトマイシンおよび/ま  
たはスペクテノマイシン耐性に関与する遺伝子  
を有する新規プラスミドに関する。

遺伝子工学におけるプラスミドベクターの有  
用性は、遺伝子工学技法の開発された大腸菌の  
宿主・ベクター系でよく知られている。遺伝子  
工学におけるベクターの役割は、レコンビナシ  
ョン・モレキュラ：インパクト・オン・サイエ  
ンス・アンド・ソサイエティ、マイルス・イン

ターナショナル・シンポジウム・シリーズ  
10 (Recombinant Molecules: Impact  
on Science and Society, Miles Inter-  
national Symposium Series 10, edited  
by R. F. Beers and E. G. Bassett, Raven  
Press, New York, 1977)に明解に解説され  
ている。

一方、大腸菌以外の工業的に有用な微生物、  
例えば、アミラーゼなどの生産菌である枯草菌、  
抗生物質などの生産菌である放線菌および醸造  
用アルコールの生産菌である酵母などでも組換  
えDNA技法を確立しようとの試みがなされて  
いる。組換えDNA技法の導入には、ベクター  
の取得が必須であるため、これらの菌種ではプ  
ラスミドやファージの検索が行われてきた。

本発明者らは、グルタミン酸、リジンなど多  
くの有用物質の工業生産に用いられるコリネバ  
クテリウム・グルタミカムならびにそれに類縁  
の菌種で組換えDNA技法を確立せんがために、  
これらの菌種のベクターとなり得るプラスミド

の検索を行なつてきた。その結果、コリネバク  
テリウム属に属する微生物中にベクターとして  
有用性を有する新規なプラスミドが存在するこ  
とを見出し、本発明を完成するに至つた。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は、コリネバクテリウム属またはプレ  
ビバクテリウム属に属する微生物中で自律複製  
でき、かつストレプトマイシンおよび/または  
スペクテノマイシン耐性に関与する遺伝子を有  
する新規プラスミドを提供するものである。

本発明のプラスミドは、そのDNA上にスト  
レプトマイシンおよび/またはスペクテノマイ  
シンに対する耐性遺伝子を所有しており、宿主  
菌に両薬剤に対する耐性形質を付与することが  
できる。このことは、所望の遺伝子を組み込んだ  
組換えプラスミド保有株の取得にあたり、そ  
の選択を効率的に行うことを可能ならしめ、コ  
リネバクテリウム属、プレビバクテリウム属、  
およびその近縁菌種におけるクローニングベク  
ターとして、極めて有用であるとともに、組換え

DNA研究用の試薬としても有用であることを  
示している。

本発明のプラスミドはコリネバクテリウム属  
またはプレビバクテリウム属菌の菌体から得ら  
れ、具体的に好適な一例としては、プラスミド  
pCO#と名付けたプラスミドがあげられる。

以下プラスミドpCO#について詳細に説明す  
る。

プラスミドpCO#の特徴

- (1) プラスミドpCO#は、分子量約17メガダ  
ルトンのデオキシリボ核酸(DNA)である。
- (2) プラスミドpCO#は下記制限酵素に対し、  
次の切断感受性を有する。

酵素 <sup>*</sup>	切断部位数
EcoR I	4
BamH I	6
Hind III	7
Pst I	6
Bal I	6

\* 制限酵素の名称は次の菌種から得られる制

限酵素の略称である。

EcoR I : エシエリヒア・コリ

BamH I : バチルス・アミロリクエファシエンシス

Pst I : プロビデンシア・ステュアーティー

Hind III : ヘモフィラス・インフルエンザ

Bal I : ストレプトマイセス・アルブス

制限酵素による切断部位数は、通常の制限酵  
素存在下でプラスミドpCO#を完全消化し、そ  
れらの消化物を8%のアガロースゲル電気泳  
動にかけ、分離可能な断片の数から決定される。  
分子量は、大腸菌のラムダファージのDNAを  
Hind III で消化して得られる分子量既知の断片  
[ J. Mol. Biol., 22, 551-564 (1975) ]  
の同一アガロースゲル上での泳動距離で推かれ  
る標準値に基づき、消化プラスミドpCO#の各  
断片の分子量を算出し、それらを加算して求め  
られる。

プラスミドpCO#は土壌から分離された菌株  
225-250から得られる。225-250株の  
菌学的性状は下記の通りである。菌学的性質の

検討は 'Manual of Microbiological Methods' by the Society of American Bacteriologist Committee on Bacteriological Technique (1957) に記載された方法で行った。

# I 細胞形態

通常  $0.7 \sim 1.0 \times 1.0 \sim 1.0$  ミクロンの円あるいは短棒状であるが、培養条件により、複数の細胞が直鎖状あるいはV字型に連鎖したような多形性を示す。グラム陽性、非運動性で胞子をつくらない。

# II 富栄養培地での生育特性

寒天培地上での単集落は円状で表面は光沢をおび、色は淡黄色である。スラント上での生育は同じく淡黄色で不透明である。寒天培地上の穿刺培養では最上部で良く生育し、底部ではわずかに生育する。液体培養ではわずかに生育し若干綿状に沈降する。

# III 生理的性質

1) 温度：至適温度は  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  だが、 $42$

℃でかすかに生育する。

2) pH：至適 pH  $7 \sim 8$  だが、pH  $6 \sim 9$  でも生育可能である。

3) 非熱耐性

4) 好気性

5) セラテンを液化しない

6) カゼインを分解代謝しない

7) イシドール生産性

8) カタラーゼ陽性

9) 澱粉非同化性

10) グルコース、フラクトース、マンノース、マルトースから酸を生成するが、キシロース、ガラクトース、ラクトースおよびグリセロールからは酸を生成しない。

11) ビオチン要求性

12) ビオチン量制限培地では多量のグルタミン酸を産生する。

13) 高濃度ビオチン含有培地では乳酸および  $\alpha$ -ケトグルタル酸を産生する。

以上の結果は、J. Gen. Appl. Microbiol.,

73, 279-301 (1967) に記載された細菌群と比較すると、コリネバクテリウム・グルタミタムに極めてよく一致している。それ故、225-230株をコリネバクテリウム・グルタミタムと同定した。

コリネバクテリウム・グルタミタム 225-230 は上記の如く分類学的特性においては、通常のコリネバクテリウム・グルタミタムと相違点が認められないが、唯一の相違点としてストレプトマイシンおよびスペクテノマイシンに対する耐性形質を保持することが特徴的である。本菌株にプラスミドの一般的除去操作を施すことによつて、ストレプトマイシンおよびスペクテノマイシン耐性形質を同時に喪失した誘導株が分離される。これらの薬剤感受性株には pCO# の存在が認められないことから、ストレプトマイシンおよびスペクテノマイシン耐性遺伝子は pCO# 上に担われていることが明白である。

なお、コリネバクテリウム・グルタミタム

225-230 およびその pCO# 消失株の一株であるコリネバクテリウム・グルタミタム 230-1 株は微生物工業技術研究所に寄託され、それらの寄託受領番号は各々 5939、5940 である。さらに、米国アメリカンタイプ・カルチャー・コレクションに各々、ATCC 31830、ATCC 31831 として寄託されている。

コリネバクテリウム・グルタミタム 225-230 の菌体中からプラスミド pCO# を抽出するためには、まず培養細胞を溶菌しなければならないが、一般にコリネバクテリウム属菌種およびその類似菌種の単に培養した細胞は、細菌細胞溶解酵素即白リゾチームに非感受性であるので培養細胞は即白リゾチームに感受性にしてから用いるとよい。コリネバクテリウム・グルタミタム 225-230 をリゾチーム感受性にするには、コリネバクテリウム・グルタミタムと同様にグラム陽性でもともと即白リゾチーム非感受性のストレプトコッカス・フェカリス [Can. J. Microbiol., 7, 363-373 (1961)]

に施される公知の方法を適用することができる。すなわち、細胞培養の対数増殖期の中で、生育を抑制しないか、あるいは半抑制する濃度（通常培養液中  $0.1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  となる濃度）のペニシリンを添加し、さらに数世代増殖させることによつて目的が達せられる。その際用いる培地および培養方法は一般にコリネバクテリウム・グルタミナムおよびその近縁菌種の培養に用いられる液体培地およびその培養方法が適用できる。このようにペニシリン処理したコリネバクテリウム・グルタミナム 333-330 の培養細胞は、リゾチームにより容易に細胞壁が溶解される。溶菌物からは、例えば Biochim. Biophys. Acta. 383, 437-463 (1975) に記載されたような通常用いられる方法により、プラスミド pCO# を容易に濃縮分離できる。

即ち、溶菌物にラウリル硫酸ナトリウムと NaCl とを加えて処理し、溶離したプラスミドを遠心分離により上澄液として回収後、これにポリエチレングリコールを添加して DNA を沈

殿凝縮し、再溶解した沈殿物をエタジウムブロマイド-塩化セシウム密度勾配遠心にかけ、プラスミド pCO# を単離する。

コリネバクテリウム・グルタミナムおよびその近縁菌種において選択可能な遺伝形質を有した自律複製可能なプラスミドの存在は今まで知られておらず、本発明者らにより初めて見出されたものである。

プラスミド pCO# は、コリネバクテリウム・グルタミナムだけでなく、コリネバクテリウム属の他の菌種あるいはプレビバクテリウム属の菌種でも自律複製できると同時にその上に存在するストレプトマイシンおよびスペクテノマイシン耐性遺伝子に由来する耐性形質をそれらの宿主菌に付与することができる。プラスミド pCO# をこれらの菌種に形質転換する方法は、本出願と同日に提出する特許出願（発明の名称：後生物の形質転換法）に開示したが、具体的方法を実施例 3 として後述する。この形質転換法により取得された菌株としては第 1 表に

pCO# として示されたものをあげることができる。

第 1 表

菌 株	pCO#	最小生育阻止濃度 (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )	
		スペクテノマイシン	ストレプトマイシン
コリネバクテリウム・グルタミナム 333-330	+	$\geq 800$	200
コリネバクテリウム・グルタミナム 330-1	-	25	32
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC/3868	-	25	32
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC/3868/pCO#	+	$\geq 800$	200
プレビバクテリウム・フラブム ATCC/4067	-	25	32
プレビバクテリウム・フラブム ATCC/4067/pCO#	+	$\geq 800$	200
プレビバクテリウム・ラクトア-ノンタム ATCC/3638	-	25	16
プレビバクテリウム・ラクトア-ノンタム ATCC/3638/pCO#	+	$\geq 800$	100

これら pCO# 保有株、すなわちコリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC/3868/pCO#、

プレビバクテリウム・フラブム ATCC/4067/pCO#、プレビバクテリウム・ラクトア-ノンタム ATCC/3638/pCO# は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され、各々寄託受理番号 5741、5742、5743 がつけられている。また米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに各々 ATCC/3867、3868 および 3869 として寄託されている。

プラスミド pCO# が分離された元株コリネバクテリウム・グルタミナム 333-330 株、それから誘導されたプラスミド pCO# 喪失株 330-1 株およびプラスミド pCO# で形質転換された他菌種の菌株のストレプトマイシンとスペクテノマイシンに対する感受性を両薬剤の最小生育阻止濃度で測定した結果を第 1 表に示した。最小生育阻止濃度は、NB 寒天培地（粉末ブイヨン 20g、酵母エキス 5g、寒天 15g を純水 1l に含み、pH 7.2 に調整した培地）上に約  $10^8$  細胞を塗布接種して 30℃

て2日間培養後、生育の全く認められない程度である。

本発明のプラスミドの有用性は、アミノ酸、核酸などの有用物質の生産に用いられる工業上重要なコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属菌種中で自律複製でき、それを保有する菌の検出を可能にするストレプトマイシンおよびまたはスペクテノマイシン耐性遺伝子を保有し、さらには種々の制限酵素の切断点を有する特性にある。

これらの特性により、本発明のプラスミドはコリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属の菌種を宿主菌にして周知のDNA組換え技法で任意の遺伝子をクローン化するのに必要なベクターとしての条件を備えている。従つて、本発明のプラスミドは、これらの細菌種または他の微生物からアミノ酸などの有用物質の生合成あるいはその調節に関与する遺伝子をクローン化し、その遺伝情報の増幅に基づく生合成系の強化により有用物質の生産量を増大せしめたり、さらには動植物の遺伝子をクローン化し、その遺伝情報の発現により有用な蛋白質を生産せしめるための手段を提供することができる。クローンは、試験管内で作成されたベクタープラスミドとの組換えDNA構成物を宿主菌に導入後、目的の遺伝子を組み込んだプラスミドを保有する株を選択することによつて行われるが、本発明プラスミド上に存在するストレプトマイシンあるいはスペクテノマイシン耐性遺伝子は目的のクローン化株の選択を容易ならしめることができる。すなわち、目的のクローン化すべき遺伝子がそれに由来する形質で選択できるときはストレプトマイシンあるいはスペクテノマイシン耐性形質の同時獲得性により目的のクローン化株の把握を確実にし得るし、また、目的のクローン化すべき遺伝子がその形質で選択できないときもその取得に先立つて一旦ストレプトマイシンあるいはスペクテノマイシン耐性形質でプラスミド保有株を選択することにより目的のクローン化株の取得を効率化し得る。

本発明プラスミドの自律複製能および宿主にストレプトマイシンあるいはスペクテノマイシン耐性形質を付与する遺伝子は、一般のプラスミドと同様にプラスミドDNAの一部分に組われていることが容易に顕推されるので、例えばプラスミドの一部欠失したり、あるいは別のDNAを挿入付加したようなプラスミド誘導体も同様な機能を有すると考えられる。

また、本発明プラスミドのストレプトマイシンあるいはスペクテノマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片は、周知のDNA組換え技法で識別可能な特徴的遺伝子をもたない他のプラスミドへ連結することができ、そのような組換え体も、ベクターとして同様な有用性を有することになる。

それゆえ、本発明プラスミドは、例示したpCO#に限定されるものではなく、それより修飾して得られる誘導体プラスミドや他のプラスミドとの組換え体プラスミドも含まれる。

以下に実施例を示す。

#### 実施例1

- (1) コリネバクテリウム・グルタミカム225-250の培養細胞からのプラスミドpCO#の分離

コリネバクテリウム・グルタミカム225-250をNB培地(粉末ブイヨン20g、酵母エキス5gを純水1ℓに含みpH7.2に調整した培地)で、30℃、18時間振盪培養し、その種培養5mlを400ml半合成培地BBM〔グルコース20g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>10g、尿素3g、酵母エキス1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1g、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.4g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 10mg、MnSO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O 0.2mg、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.9mg、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O 0.4mg、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>・10H<sub>2</sub>O 0.09mg、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>・4H<sub>2</sub>O 0.04mg、ビオチン30μg、サイアミン塩酸塩1mgを純水1ℓに含み、pH7.2に調整した培地〕に接種して30℃で振盪培養する。東京光電比色計で660nmに於ける吸光度(OD)を測定し、OD0.2になつた

時点で、培養液中の $\lambda$ 単位/μlの濃度になるようにペニシリンGを添加する。さらに30℃で培養を継続し、OD約0.6になるまで生育させる。

培養液から菌体を集菌し、TEB緩衝液〔0.05Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)、0.005M EDTA、0.05M NaCl: pH 8.0〕で洗浄後、リゾチーム液(25gシロコ、0.1M NaCl、0.05Mトリス、0.8g/μlリゾチーム: pH 8.0)で10μlに懸濁し、37℃で4時間反応させる。反応液に、0.1M NaCl 2μl、0.5M EDTA (pH 8.5) 0.6μl、4%ラウリル硫酸ナトリウムと0.7M NaClからなる溶液4μlを順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に15時間置く。溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で60分間、 $4.2 \times 10^5 \times g$ の遠心分離をかけ上澄液をとる。これに重量百分率10%相当のポリエチレングリコール4000を加え、静かに混和して溶解後氷水中に置く。

このようにして得られるプラスミドpCO#を含む透析液1μlに2μlのエタノールを加え、-20℃に15時間おいた後、 $10,000 \times g$ で30分遠心分離してDNAを沈降させ、さらに真空乾燥を行つて20μgのプラスミドpCO#が得られる。

## (2) プラスミドpCO#の各種制限酵素による切断特性および分子量。

前記で調製したプラスミドpCO# 0.5μgを10μlのTEB緩衝液(pH 8.0)に溶かし、2倍過剰量の制限酵素(EcoR、BamH、HindⅢ、PstⅠおよびSalⅠは宝酒造社製のものを使つた)を各々の制限酵素の適正条件にて反応させた。消化した試料は常法に従い、エタジウムブロマイド0.6μg/μlを含有する水平型の8×アガロースゲルに供し、巾1cm当たり7Vの一定付加電圧で3~4時間泳動を行つた。紫外線ランプをゲル平板上に照射して生成断片の数を判定し、各断片の泳動距離から各々の分子量を算出し、

16時間後、 $1.500 \times g$ で10分間遠心分離してペレットを回収する。TEB緩衝液3μlを加えて、ペレットを静かに再溶解してから1.5μg/μlエタジウムブロマイド20μlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し、密度を1.580に合わせる。この溶液を10.5000×g、18℃で48時間遠心分離する。この密度勾配遠心により、共有結合で閉じられた環状のDNAは、紫外線ランプを照射することによつて遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出される。このバンドを注射器で遠心チューブの側面から抜きとることによつて、プラスミドpCO#が分離される。次いで分画液を等容量のイソプロピルアルコール液〔容量百分率90%イソプロピルアルコール、10%TEB緩衝液(この緩液中に飽和溶解量の塩化セシウムを含む)〕で3回処理してエタジウムブロマイドを抽出除去し、しかる後に、TEB緩衝液に対して透析する。

それらを加算してプラスミドpCO#の分子量を求めた。なお、分子量は同一アガロースゲル上で同時に泳動したラムダファージDNAのHindⅢ消化で生成する分子量既知の各断片の泳動距離で描かれる標準線に基づいて算定した。結果を第2表に示す。

第 2 表

酵素	切断部位数	各生成断片の分子量 (メガダルトン)	加算して得られるpCO# の分子量 (メガダルトン)
EcoRⅠ	4	287, 281, 473, 422	2025
BamHⅠ	6	226, 271, 237, 203, 132, 086	1895
HindⅢ	9	213, 462, 303, 193, 133, 097, 082, 079, 037	1903
PstⅠ	6	291, 473, 362, 130, 126, 079	1983
SalⅠ	6	232, 476, 414, 130, 127, 087	1964

## 実施例2

コリネバクテリウム・ヘーケユリスA TCC  
13868、プレビバクテリウム・フラブム

A T C C / # 0 6 7 およびプレバクテリウム・ラクトフアーメンタム A T C C / 3 6 5 5 の p C O # 保有株の調製

N B 培地で培養した種培養の 0.075 ml を 7.5 ml S B M 培地に接種し、30℃で振盪培養する。東京光電比色計で 660 nm にあける吸光度 (O D) を測定し、O D 0.5 になった時点で 0.5 単位/ml になるようにペニシリン G を添加する。さらに O D 約 0.5 になるまで培養する。培養液から細胞を集菌し、該細胞を S B M で洗浄し、最終濃度 0.5 mg/ml のリゾチームを含む P F M 培地 (S B M 2 倍希釈液中にシロ糖 0.4 M、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.01 M を含み、pH 7.6 に調整した培地) 2 ml に懸濁する。30℃で 12 時間反応して細胞をプロトプラスト化する。

プロトプラスト懸液 0.5 ml を小試験管にとり、 $2500 \times g$  で 5 分間遠心分離し、沈降した細胞を T B M C 緩衝液 [10 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、500 mM コハク酸二ナトリウム、50 mM トリス (ヒドロキシメチル)

アミノメタン (トリス) ; pH 7.5] / ml に懸濁して遠心沈降する。0.1 ml の T B M C 緩衝液を加えゆるやかに振つてプロトプラストを再懸濁する。これに上記の 2 倍高濃度の T B M C 緩衝液と 1 対 1 に混合した p C O # DNA 液 0.1 ml (0.2  $\mu g$  DNA 含有) を加えて混和し、次いで T B M C 緩衝液中に 20  $\mu$ g ポリエチレングリコール 4000 を含む液 0.5 ml を添加してゆるやかに混合する。3 分後、R C O 培地 (グルコース 5  $\mu$ g、カゼインヒドロライゼート 5  $\mu$ g、酵母エキス 2.5  $\mu$ g、 $K_2HPO_4$  2.5  $\mu$ g、 $KH_2PO_4$  1.5  $\mu$ g、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.4  $\mu$ g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0  $\mu$ g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  2  $\mu$ g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.9  $\mu$ g、 $(NH_4)_4MoO_7O_{24} \cdot 4H_2O$  0.04  $\mu$ g、ビオチン 30  $\mu$ g、サイアミン塩酸塩 2  $\mu$ g、コハク酸二ナトリウム / 3.5  $\mu$ g を純水 / 1 ml に含み、pH 7.2 に調整した培地) 2 ml を添加し、 $2500 \times g$  で 5 分間遠心に掛けて上澄み液を除去し、沈降したプロトプラストを 1 ml の R C O 培地に懸濁し、直ちに R C O 培地で希釈し、一

定量を R C O P 寒天培地 [R C O 培地に 5  $\mu$ g ポリビニールピロリドン (重合度 500) と 1  $\mu$ g 寒天を含む培地] に塗布して 30℃で 10 日間培養する。

R C O P 寒天培地上に再生増殖した菌を白金耳でかき集め、N B 培地 2 ml に懸濁した菌液を希釈し、一定量を 1.25  $\mu g$ /ml のストレプトマイシンを含む N B 寒天培地に塗布する。30℃で 2 日間培養して出現したコロニーをスペクテノマイシン 100  $\mu g$ /ml を含有する N B 寒天培地にレブリカ塗布し、30℃で 2 日間培養して生育した株を p C O # の形質転換供体株として取得した。

コリネバクテリウム・ハーキュリス A T C C / 3 8 6 8 / p C O #、プレバクテリウム・フラブム A T C C / # 0 6 7 / p C O # およびプレバクテリウム・ラクトフアーメンタム A T C C / 3 6 5 5 / p C O # はこうして得られた株である。これらの株の培養菌体から実施例 1 と同じ方法でプラスミドを単離し、各種制限酵素によるプ

ラスミド DNA の切断様式を調べた結果、p C O # と全く同一の切断片を生成した。

特許出願人 (102) 協和薬研工業株式会社

代表者 木下 祝 郎





手 続 補 正 書

昭和57年 6月 16日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第58188号

2. 発明の名称

新規プラスミド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL: 03-201-7211 内線 2751)

代表者 木 下 祝 郎

4. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙のとおり修正する。

特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物中で自律複製でき、かつストレプトマイシンおよび/またはスペクテノマイシン耐性に関連する遺伝子を有する新規プラスミド。
- (2) 該プラスミドが、コリネバクテリウム属微生物から得られることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。
- (3) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルタミクムに属する微生物であることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載のプラスミド。
- (4) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルタミクム225-250であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のプラスミド。
- (5) 該プラスミドが、コリネバクテリウム・グルタミクム225-250から得られ、約19メガダルトンの分子量を有し、かつ制限酵素に対する感受性部位数が  $\text{NotI}$ 、 $\text{BamHI}$ 、 $\text{HindIII}$ 、

特開昭57-183799(8)

- (2) 明細書第3頁2行目の「Impact」を「Impact」に訂正する。
- (3) 明細書第12頁最下行の「として」を削除する。
- (4) 明細書第13頁1~2行目を「示した。」に訂正する。
- (5) 明細書第18頁10行目の「グルコース20g」の後に「、」を加入する。

$\text{PstI}$  および  $\text{BstI}$  においてそれぞれ4、7、9、6および6であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のプラスミド。

- (6) 特許請求の範囲第1項記載のプラスミドの一部領域を欠失させるか、該プラスミドに他のDNA断片を挿入するか、またはその両者をして得られるプラスミド誘導体。

手 続 補 正 書

昭和56年12月17日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第58186号

2. 発明の名称

新規プラスミド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和薬業工業株式会社

(TEL: 03-201-7211内線 2751)

代表者 木 下 祝 郎

4. 補正の対象

願書の「図付書類の目録」の欄、明細書の「特許請求の範囲」の欄、「発明の詳細な説明」の欄および「図面の簡単な説明」の欄

5. 補正の内容

DNAを異なる制限酵素で切断してもいずれも平滑末端のときは連結できる。また両DNAを異なる接着末端を与える制限酵素で切断したときもエキソヌクレアーゼやS1ヌクレアーゼで末端の一本鎖を削りとるか、DNAポリメラーゼで一本鎖部分を修復して平滑末端にしてから連結することが可能である。

リガーゼ反応により目的の組換え体以外に同一断片どうしが連結したものも生成するが目的の組換え体を取得するにはこのDNA混成液を用いてコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌種を形質転換し、ストレプトマイシンあるいはスペクテノマイシン耐性形質を獲得した形質転換株を選択分離しその培養菌体から抽出単離することによって達成できる。その一例としてpCO11をあげることができる。pCO11の具体的な作製法は実施例3に後述する。pCO11は先に特許出願(特願昭56-18101)したコリネバクテリウム・グルタミクム225-57

特願昭57-183799(9)

(1) 明細書第17頁下から2行目の後に次の記載を加入する。

「pCO4由来のストレプトマイシンおよび/またはスペクテノマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を他のコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属菌種のプラスミドへ連結した組換え体プラスミドの作製は、公知の試験管内DNA組換え技法を駆使することにより可能である。試験管内DNA組換えは基本的にはpCO4の耐性遺伝子を含むDNA断片をプラスミド断片にDNAリガーゼを用い連結せしめることによつて行われる。DNAの断片化は通常制限酵素を用いれば容易にできる。連結はT4ファージDNAリガーゼを用いて行われる。この酵素は相補性の一本鎖末端を有する異種DNA断片だけでなく平滑末端を有する異種DNA断片をも連結できる特性をもっているため、同一制限酵素で両DNAを切断した場合には、それらの末端が接着末端であれ、平滑末端であれ連結できる。両

(ATCC 31808, FERM-P 5865)から分離されたプラスミドpCO1中に1ヶ所だけ存在する制限酵素BglI(バチルス・グロビギイから分離される制限酵素)切断部位にpCO4のストレプトマイシンおよび/またはスペクテノマイシン耐性遺伝子を含む2.5メガダルトンのBamHI切断DNA断片をそれら同一接着末端を利用してT4ファージDNAリガーゼで連結して得たものであり、第1図に示す制限酵素切断地図で特徴づけられる構造を有している。

pCO11は、コリネバクテリウム・グルタミクムLA103(L-22菌株)内で自律複製し、ストレプトマイシンおよび/またはスペクテノマイシン遺伝子を選択マーカーとしてもつていたのでpCO4と同様な有用ベクターとなる。さらにpCO11はpCO4に較べ各種制限酵素による切断点が少ないため、自律複製能および耐性遺伝子を損うことなく、試験管内DNA組換え技法によるDNA断片

のクローン化を容易ならしめる利点を有している。

pC04に由来するストレプトマイシンおよび/またはスペクテノマイシン耐性遺伝子を有する組換え体プラスミドはコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属で複製できる他のプラスミドを用いても試験管内組換え技法により作製でき同様の有用性を有する。それゆえ有用な組換え体プラスミドはpC011に限定されるものではない。

組換えDNA実験に使用できる宿主は規制されているため、組換えプラスミド(pC011)の有用性はコリネバクテリウム・グルタミクムLA103を宿主菌として示したが、前述のようにpC04がコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種で共通してベクターとしての機能を有することを考慮すればpC04とコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種で自律複製できる他のプラスミドとの組換え体プラスミドであるpC011

もコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種全般にその有用性を適用できることは言うまでもない。

なお、pC011保有株コリネバクテリウム・グルタミクムLA103/pC011は米国、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションにATCC 39022として寄託されている。

(2) 実施例2の後に下記「実施例3」ならびに「4図面の簡単な説明」の欄を加入する。

#### 「実施例3 pC011の作製

コリネバクテリウム・グルタミクム225-250からpC04を分離したのと同じの方法によりコリネバクテリウム・グルタミクム225-57からpC01を分離する。プラスミドpC01を制限酵素BglⅠ(パナルス・ドロビゲイから分離精製される制限酵素)(宝酒造社製)、プラスミドpC04を制限酵素BamHI(宝酒造社製)で各々の制限酵素の適正条件にて完全消化する。両消化DNAを各

0.5μg含むリガーゼ反応液(最終濃度: 6.6 mM トリス塩、6.6 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM シチオスレイトール、0.5 mM ATP、pH 7.6) 0.2 mlに0.1単位のT4ファージDNAリガーゼ(宝酒造社製)を混和し、4℃で一晩反応する。この連結反応液を用いてコリネバクテリウム・グルタミクムLA103株のプロトプラストを形質転換する。

コリネバクテリウム・グルタミクムLA103株のプロトプラストは実施例2の方法のうち、培養途中のペニシリンG添加処理を除いた以外同じようにして調製する。形質転換操作および形質転換株の選択も実施例2と同様に行う。形質転換には上記連結反応液0.1 mlを使用する。得られたスペクテノマイシン耐性株の一株から培養中のペニシリンG添加処理を省いた以外実施例1と同様な方法によりプラスミドを単離し、50μgのプラスミドDNAを得る。このプラスミドDNAを用い、各種制限酵素による単独消化および複数の制限酵

素による多重消化で生成するDNA断片を実施例1と同様なアゲロースゲル電気泳動で解析し、分子量およびプラスミド分子中の各制限酵素に対する切断部位を決定した。pC011と命名したこのプラスミドの制限酵素切断地図を第1図に示す。

pC011プラスミドDNAを用いて前記と同様にコリネバクテリウム・グルタミクムLA103株を形質転換して得られたスペクテノマイシン耐性形質転換菌はpC011と同一の各種制限酵素の切断様式で特徴づけられるプラスミドを保有していた。

#### 4 図面の簡単な説明

第1図はpC011の制限酵素EcoRI、PstⅠ、BglⅠおよびHaeⅢ(ヘモフィラス・インフルエンザから分離精製される制限酵素)による切断地図を示す。図中の破線で記したBglⅠ/BamHIは連結部位を示す。」

(3) 明細書第5頁16行目の「BamH 6」を「BamH 7」に訂正する。

- (4) 明細書第22頁第2表中「Bam HI」の項を  
下記のごとく訂正する。

## 特 許 請 求 の 範 囲

断 断	切 断	各生成断片の分子量 (メガダルトン)	加算して得られる pC04の分子量 (メガダルトン)
Bam HI	7	825, 257, 251, 198, 195, 143, 98	1949

- (5) 特許請求の範囲を別紙のとおり訂正する。  
(6) 第1図を別紙のとおり補充する。  
(7) 願書の「4 添付書類の目録」の欄に「(2)  
図面 1通」を加入する。

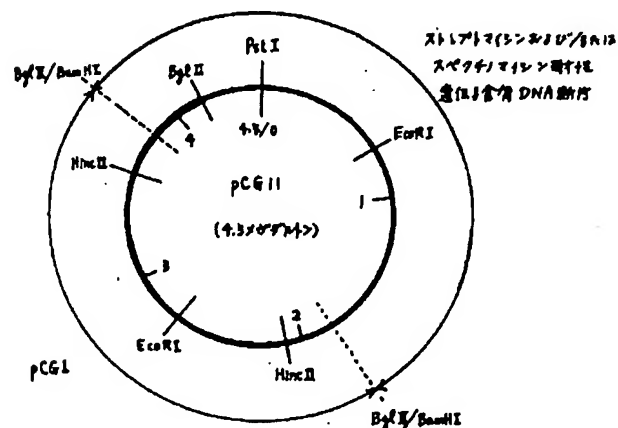
## 6. 添付書類の目録

図 面 1通

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリ  
ウム属に属する微生物中で自律複製でき、かつ  
ストレプトマイシンおよび/またはスペクチノ  
マイシン耐性に関与する遺伝子を有する新規プ  
ラスミド。  
(2) 該プラスミドが、コリネバクテリウム属微生  
物から得られることを特徴とする特許請求の範  
囲第1項記載のプラスミド。  
(3) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルタミ  
クムに属する微生物であることを特徴とする特  
許請求の範囲第2項記載のプラスミド。  
(4) 該微生物が、コリネバクテリウム・グルタミ  
クム225-250であることを特徴とする特  
許請求の範囲第3項記載のプラスミド。  
(5) 該プラスミドが、コリネバクテリウム・グル  
タミクム225-250から得られ、約19メ  
ガダルトンの分子量を有し、かつ制限酵素に対  
する感受性部位数が NotI、BamHI、HindIII、

PstIおよびBclIにおいてそれぞれ4、7、  
9、6および6であることを特徴とする特許  
請求の範囲第1項記載のプラスミド。

第 1 図



昭 62. 10. 19 発行

手 続 補 正 書

昭和62年5月28日

特 許 庁 長 官 殿



特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 56 年特許願第 58186 号(特開 昭  
57-183799 号, 昭和 57 年 11 月 12 日  
発行 公開特許公報 57-1838 号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 3 ( 2 )

Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
C07H 21/00		7138-4C
C12N 15/00		7115-4B
// C12R 1/13		
1/15		

1. 事件の表示

昭和56年特許願第58186号

2. 発明の名称

新規プラスミド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL: 03 - 282 - 0036)

代表者 加藤 幹 夫



4. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

(1) 明細書第10頁3～5行目「それらの」で

ある。」を「それらの受託番号は各々、微工研  
菌寄第5939, 5940号である。」に訂正  
する。

(2) 明細書第14頁4～6行目「各々……つけら  
れている。」を「各々受託番号 微工研菌寄第  
5941, 5942, 5943号がつけられて  
いる。」に訂正する。

6. 添付書類の目録

微生物受託番号通知書(写) 1通